

ФАРМАКОЛОГИЯ

М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко,
В.Ю. Смирнов

ЭФФЕКТЫ ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ, ВВОДИМОЙ В НОЧНОЕ ВРЕМЯ, НА СОДЕРЖАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ГИДРОКСИЛАЗНОГО ПУТИ ОБМЕНА L- ТРИПТОФАНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И НЕКОТОРЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Гродненский государственный
медицинский университет

Вальпроевая кислота (VPA) в дозе 400 мг/кг в ночное время не изменяет уровней триптофана (Trp), серотонина 5-НТ и мелатонина (Mel) в плазме крови крыс спустя 1,5 ч после внутривенного введения. В гипоталамусе повышались уровни 5-НТ, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-HIAA) и N-ацетилсеротонина (NAS), в среднем мозге – Trp, 5-гидрокситриптофана (5-НТР) и снижалось содержание NAS. Введение VPA также снижало уровень NAS в лобной доле коры больших полушарий. Содержание Trp и исследованных его метаболитов в стриатуме не изменялось. В эпифизе снижался уровень 5-НТ, однако содержание NAS и Mel не изменялось. Таким образом, введение VPA в ночное время способно изменять оборот серотонина в некоторых отделах мозга крыс и не влияет на секрецию Mel.

ВВЕДЕНИЕ

Вальпроевая кислота (2-пропилпентановая кислота, ди-н-пропилацетат, VPA) представляет собой насыщенную монокарбоновую кислоту с разветвленной углеводородной цепью. VPA и ее натриевая соль являются сильными антиэpileптическими и стабилизирующими настроение препаратами [1].

Вальпроат – препарат, способный увеличивать уровни γ -аминомасляной кислоты (ГАМК, GABA), модифицировать оборот и выброс нейромедиатора, снижать

синтез и выброс γ -гидроксипутирата, снижать уровень аспартата (Asp) [2], ингибировать ГАМК-трансаминазу в ЦНС [3], изменять активность изоформ деацетилазы гистонов [1] и, возможно, снижать поток Ca^{2+} в нейронах [2]. VPA способна увеличивать оборот серотонина и дофамина в некоторых структурах мозга, но роль этих изменений, влияющих на различные фармакодинамические эффекты вальпроата, мало изучена [4]. Введение ди-н-пропилацетата способно угнетать активный транспорт GABA [5], гомованилиновой кислоты и 5-гидроксииндолуксусной кислоты [6] из головного мозга в кровь.

В условиях *in vivo* VPA оказывает нейропротективный эффект, увеличивая экспрессию мРНК нейротрофического фактора и подтипа рецептора мелатонина MT_1 в головном мозге крыс [1]. Вальпроат способен значительно снижать чувствительность продукции мелатонина при воздействии светом в ночное время у людей, получавших препарат по 200 мг в течение 5 дней, не оказывал эффекта на увеличение секреции мелатонина [7].

Были описаны острые эффекты вальпроевой кислоты в различных дозах и в различных отделах мозга крыс на содержание метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана. Так, VPA в дозе 500 мг/кг спустя 1 ч после введения увеличивала содержание Trp и 5-HIAA в полушариях головного мозга крыс при неизменных уровнях 5-НТР и 5-НТ. Повышение уровня 5-HIAA было связано с ингибированием ее транспорта из мозга [8]. VPA спустя 1 ч в амигдале повышала содержание серотонина [9]. VPA в дозах 100, 200, 400 мг/кг вызывала дозозависимое увеличение уровня 5-НТ, но не 5-HIAA в вентральном гиппокампе [10].

Эффекты VPA на метаболизм 5-НТ были описаны и при хроническом его введении. Так, введение VPA в дозе 300 мг/кг в течение 10 дней приводило к повышению уровня Trp и 5-HIAA в стволе мозга [11].

Введение вальпроата натрия в дозе 200 мг/кг в течение 45 дней давало увели-

чение уровней 5-НТ в стволе и striatum-accumbens. Снижение содержания 5-НТ отмечалось в гипоталамусе и мозжечке. Авторы полагают, что действие вальпроата как антиконвульсанта может реализовываться через изменение уровней моноаминов, которые оказывают действие на GABA [12].

Целью данной работы явилась оценка эффектов вальпроевой кислоты (как фармакологического агента, способного изменять оборот серотонина в некоторых структурах мозга), на уровне метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в плазме крови и отделах головного мозга крыс. Поскольку содержание этих метаболитов, в особенности N-ацетилсеротонина и мелатонина, подвержена циркадианным изменениям, представляется целесообразным оценить эффекты VPA на содержание и продукцию этих соединений при искусственном световом цикле при введении VPA в темновой фазе, когда продукция мелатонина максимальна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались 12 белых беспородных крыс-самцов массой 150-200 г, которые содержались в течение двух недель при искусственном световом режиме день/ночь (12ч /12ч). Начало темновой фазы приходилось на 21:00, а окончание – на 9:00. Внутривенное введение VPA осуществлялось в дозе 400мг/кг [10,13,14] в начале темновой фазы. Контрольная группа получала эквивалентные количества воды. Спустя 1,5 ч животных декапитировали. Извлеченные отделы мозга помещали в жидкий азот. Гомогенизацию биологического материала (гипоталамуса, стриатума, среднего мозга, лобной доли коры) производили тефлоновым пестиком в 10-кратном объеме среды, содержащей 0,2 М хлорной кислоты, 25 мг/л ЭДТА и 1 мкМ ванилиновой кислоты (VA) (внутренний стандарт), а эпифиза – в 100 мкл такой среды. Центрифугировали 15 мин при 13000 g. Супернатанты замораживали и хранили при –78 °С.

Кровь собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали 15 мин при 3000g. К полученной плазме добавляли равные объемы среды для депротеинизации, содержащей 1 М хлорной кислоты, 25 мг/л ЭДТА, 25 мг/л Na₂S₂O₅ и 1 мкМ ванилиновой кислоты (VA) в качестве внутреннего стандарта. Центрифугировали 15 мин. при 13000g. Собранные супернатанты замораживали и хранили при –78°С.

Для работы использовался препарат «Орфирил», содержащий 60 мг/мл вальпроевой кислоты (Farmacia, Польша).

Для приготовления подвижных фаз использовали химически чистый ацетонитрил, метанол (Merck, Германия), KН₂РO₄, ЭДТА (Reanal, Венгрия), октилсульфонат натрия (Элсико, Россия), ледяную уксусную кислоту. В качестве эталонных соединений применяли L-триптофан (Trp), серотонин креатинин-сульфат (5-НТ) (Reanal, Венгрия), мелатонин (Mel), 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-НIAA), N-ацетилсеротонин (NAS), ванилиновую кислоту (VA), 5- гидрокситриптофан 5-НТР (Sigma, США).

Тридистиллированную воду для подвижных фаз дополнительно очищали пропусканием через патрон («Norganic», Millipore, США). Кроме того, буферные растворы пропускали через мембранный фильтр Millipore GV с размером пор 0,22 мкм.

Определение триптофана и его метаболитов проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 с детектором флуоресценции (G1321A, Германия). Колонка диаметром 3 мм и длиной 250 мм Separon SGX C₁₈, 8 мкм (Элсико, Россия) термостатировалась при 30°С в термостате для хроматографических колонок (G1316A). Скорость потока элюента - 0,5 мл/мин. Введение образцов осуществлялось автосамплером (ALS G1313A), объем 20 мкл. Детектирование по природной флуоресценции при длине волны возбуждения 280 нм и испускания 340 нм. Для определения NAS и Mel использовали подвижную фазу, содержащую ацетонитрил 18,67% (об.), октилсульфонат натрия 1,67 мМ, уксусную кислоту 17 мМ, ЭДТА 25 мг/л и дигидрофосфат калия 0,1

М. Для определения Trp, 5-НТР, 5-НТ, 5-НІАА использовали подвижную фазу, содержащую 0,1 М дигидрофосфата калия, 17 мМ уксусной кислоты, 25 мг/л ЭДТА, 1 мМ гептилсульфоната натрия, 0,8 мМ октилсульфоната натрия и 11% метанола (об.).

Интегрирование и расчет содержания триптофана и его метаболитов проводили с помощью программы ChemStation версии А.10.01[15]. Статистическая обработка данных (t-критерий Стьюдента и корреляционный анализ) реализована программой Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вальпроевая кислота в дозе 400 мг/кг, вводимая в темновую фазу, спустя 1,5 ч не вызывала достоверных изменений в содержании Trp, 5-НТ и Mel в плазме крови (таблица 1), изменений не отмечалось также в содержании Trp, 5-НТР, 5-НТ, 5-НІАА, NAS и Mel в стриатуме (таблица 2). В гипоталамусе повышались уровни 5-НТ, 5-НІАА, NAS (таблица 3). Вальпроевая кислота повышала в среднем мозге концентрации триптофана и 5-гидроксириптофана, в то время как уровень NAS был снижен, как и в лобной доле коры (таблицы 4, 5). В эпифизе препарат снижал содержание 5-НТ (таблица 6).

Таблица 1 - Содержание триптофана (мкмоль/л) и его метаболитов (нмоль/л) в плазме крови крыс через 1,5 ч после введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в темновую фазу, среднее \pm s.e.m.

	Контроль	Вальпроевая кислота, 400 мг/кг
Trp	83,8 \pm 4,19	66,7 \pm 7,0
5-НТ	1,91 \pm 0,24	1,93 \pm 0,36
Mel	0,0276 \pm 0,0124	0,0083 \pm 0,0019

Таблица 2 - Содержание триптофана и его метаболитов в стриатуме крыс через 1,5ч после введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в темновую фазу (нмоль/г ткани), среднее \pm s.e.m.

	Контроль	Вальпроевая кислота, 400 мг/кг
Trp	17,11 \pm 1,36	21,88 \pm 2, 351
5-НТР	0,27 \pm 0,02	0,21 \pm 0,017
5-НТ	0,81 \pm 0,11	0,90 \pm 0,099
5-НІАА	0,44 \pm 0,07	0,57 \pm 0,131
NAS	0,069 \pm 0,024	0,060 \pm 0,0104
Mel	0,070 \pm 0,048	0,040 \pm 0,0097

Таблица 3 - Содержание триптофана и его метаболитов в гипоталамусе крыс через 1,5ч после введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в темновую фазу (нмоль/г ткани), среднее \pm s.e.m.

	Контроль	Вальпроевая кислота, 400 мг/кг
Trp	15,19 \pm 2,07	21,73 \pm 3,02
5-НТР	0,23 \pm 0,02	0,32 \pm 0,06
5-НТ	1,72 \pm 0,15	2,44 \pm 0,25*
5-НІАА	0,42 \pm 0,04	0,78 \pm 0,14*
NAS	0,039 \pm 0,006	0,071 \pm 0,007*
Mel	0,066 \pm 0,011	0,082 \pm 0,023

*- $P < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 4 - Содержание триптофана и его метаболитов в среднем мозге крыс через 1,5 ч после введения вальпроевой кислоты (400мг/кг) в темновую фазу (нмоль/г ткани), среднее \pm s.e.m.

	Контроль	Вальпроевая кислота, 400 мг/кг
Trp	16,02 \pm 1,95	22,88 \pm 2,362*
5-НТ	0,19 \pm 0,03	0,29 \pm 0,031*
5-НТ	1,39 \pm 0,08	1,86 \pm 0,23
5-НІАА	0,56 \pm 0,11	0,96 \pm 0,23
NAS	0,041 \pm 0,0024	0,022 \pm 0,0032*
Mel	0,049 \pm 0,012	0,050 \pm 0,0226

*– $P < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 5 - Содержание триптофана и его метаболитов в лобной доле коры больших полушарий крыс через 1,5 ч после введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в темновую фазу (нмоль/г ткани), среднее \pm s.e.m.

	Контроль	Вальпроевая кислота, 400 мг/кг
Trp	17,8 \pm 3,02	22,7 \pm 0,042
5-НТ	0,4 \pm 0,093	0,2 \pm 0,042
5-НТ	1,1 \pm 0,203	1,2 \pm 0,393
5-НІАА	0,3 \pm 0,102	0,6 \pm 0,1
NAS	0,06 \pm 0,0046	0,04 \pm 0,0061*
Mel	0,02 \pm 0,005	0,02 \pm 0,0027

*– $P < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 6 - Содержание триптофана и его метаболитов в эпифизе крыс через 1,5ч после введения вальпроевой кислоты (400 мг/кг) в темновую фазу (нмоль/эпифиз), среднее \pm s.e.m.

	Контроль	Вальпроевая кислота, 400 мг/кг
Trp	0,028 \pm 0,003	0,023 \pm 0,0019
5-НТ	0,0082 \pm 0,0007	0,0099 \pm 0,0036
5-НТ	0,1641 \pm 0,0081	0,1125 \pm 0,0218*
5-НІАА	0,005 \pm 0,0012	0,0043 \pm 0,0012
NAS	0,0053 \pm 0,0003	0,0042 \pm 0,00045
Mel	0,0051 \pm 0,00064	0,0066 \pm 0,0019

*– $P < 0,05$ по сравнению с контролем

В гипоталамусе вальпроат вызывал достоверное повышение концентрации 5-НІАА, кроме этого отмечалось исчезновение положительных корреляций между уровнями Trp, с одной стороны, и содержанием 5-НТ и 5-НІАА, с другой. Наряду с отмеченными изменениями в этой структуре мозга был повышен уровень 5-НТ. Появлялась положительная корреляционная связь между содержанием Mel и 5-НТ ($r = 0,98$) и отрицательная – между содержанием Mel в плазме и 5-НТ ($r = -0,89$) в гипоталамусе. Такие изменения свидетельствуют об угнетении деградации серотонина и активного транспорта его кислого метаболита из мозга, так как на фоне этого не изменялись уровни Trp и 5-НТ.

Исчезала положительная корреляционная связь между уровнями 5-НТ в плазме и уровнями Trp и 5-НТ в гипоталамусе, а также между уровнем Mel в плазме и Trp в гипоталамусе.

Возможным объяснением этого может служить снижение функциональной активности нейронов гипоталамуса по причине ослабления регулирующих влияний мелатонина на катаболизм триптофана. В пользу этого свидетельствует также повышение уровня NAS и появление отрицательной связи между уровнем 5-НТ в плазме и NAS ($r = -0,96$) в гипоталамусе и исчезновение положительной связи NAS – Mel. Эти изменения могут объясняться повышением активности N-ацетил-

трансферазы, возможно за счет увеличения доступности субстрата и/или путем ослабления угнетающего влияния мелатонина на активность этого фермента [16]. Возможное влияние Mel на активность этого фермента косвенно подтверждается исчезновением связи Mel – NAS.

В среднем мозге повышение уровня Trp и 5-HTP может объясняться усилением гидроксилирования триптофана за счет возросшей доступности предшественника в нейронах. Появление положительной корреляции между уровнями серотонина в плазме крови и среднем мозге ($r = 1,0$), а также наблюдаемая тенденция увеличения содержания 5-HIAA свидетельствуют об ускорении синтеза и распада медиатора, связанное с возрастанием функциональной активности нейронов в этой структуре мозга в ответ на введение VPA.

В лобной доле коры снижался уровень NAS. Вальпроат вызывал исчезновение положительных связей в парах Trp – 5-HIAA, 5-HTP – 5-HT и отрицательной корреляционной связи в паре NAS – 5-HIAA. Наблюдалось появление отрицательных корреляционных отношений между уровнями 5-HT и NAS ($r = -0,92$), Mel ($r = -0,94$) и положительных – в паре 5-HTP – Mel ($r = 0,92$). Исчезали положительные корреляционные отношения между уровнями Mel в плазме и Trp, а также 5-HT в коре и между содержанием серотонина в плазме крови и лобной доле коры. Усиливалась корреляция между содержанием Mel в плазме и 5-HIAA в ткани ($r = 0,83$ в контроле и $r = 0,88$ после приема препарата).

Анализ корреляционных связей показывает, что изменение активности арилалкиламин-N-ацетилтрансферазной реакции связано с вовлечением мелатонина в регуляцию активности фермента, а не за счет изменения содержания субстрата, поскольку уровень 5-HT в лобной доле не изменялся.

В эпифизе достоверно понижался уровень серотонина, однако содержание NAS и Mel не изменялось. Также не изменялся уровень Mel в плазме, что свидетельствует о неизменной секреции этого гормона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вальпроевая кислота, вводимая внутривентрикулярно в дозе 400 мг/кг в темную фазу, спустя 1,5 ч не изменяет уровней метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана, как и самой аминокислоты в плазме крови крыс. В гипоталамусе снижается деградация 5-HT с параллельным угнетением транспорта 5-HIAA и увеличением синтеза NAS. VPA изменяет функциональное состояние нейронов среднего мозга и снижает ацетилирование серотонина в лобной доле коры, с которой средний мозг находится в функциональной связи. Эти изменения в метаболизме серотонина, возможно, связаны с вовлечением мелатонина в регуляторные механизмы в этих отделах мозга.

Таким образом, часть эффектов VPA может опосредоваться как через прямое действие мелатонина, так и через его рецепторы. В эпифизе вальпроат не оказывает влияния ни на содержание Mel, ни на его секрецию, однако уровень 5-HT снижается. Следовательно, эффекты VPA не исчерпываются описанными в литературе механизмами.

SUMMARY

M.M. Zolotukhin, Ye. M. Doroshenko,
V.Yu. Smirnov

EFFECTS OF VALPROIC ACID ENTERED AT NIGHT, ON THE CONTENT OF METABOLITES OF THE HYDROXYLASE WAY OF EXCHANGE OF L-TRYPTOPHAN IN BLOOD PLASMA AND SOME DEPARTMENTS OF THE BRAIN OF RATS

The intragastrical administration of valproic acid (VPA, 400 mg/kg) during dark phase was found to have no effect on levels of Trp, 5-HT and Mel in blood plasma. VPA increased concentrations of 5-HT, 5-HIAA, and NAS in the hypothalamus, with content of Trp and its metabolites in striatum being unchanged. In the midbrain levels of Trp and 5-HTP were increased. The levels of NAS were decreased in both midbrain and frontal cortex. The content of 5-HT but not of NAS and Mel were decreased in pineal gland. We conclude the intragastrical administration of VPA

stimulates synthesis and degradation of 5-HT in several brain areas of rats and has no effect on the secretion of melatonin.

ЛИТЕРАТУРА

1. Castro, L.M. Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells / L.M. Castro, L.P. Gallant, M. Niles // J. Neurochem.—2005. — Vol. 95, N5. — P. 1227-1236.
2. Chapman, A.G. Sodium valproate — current status of pharmacological research / A.G. Chapman // Schweiz. Rundsch. Med. Prax. — 1994. — Vol. 83, N 40. — P. 1106-1110.
3. The modification of the ethanol withdrawal syndrome in rats by di-n-propylacetate / E.P. Noble [et al.] // Psychopharmacologia. — 1976. — Vol. 46, N 2. — P. 127-131.
4. Loscher, W. Valproate and its major metabolite E-2-en-valproate induce different effects on behaviour and brain monoamine metabolism in rats / W. Loscher, D. Honack // Eur. J. Pharmacol. — 1996. — Vol. 299, N1-3. — P. 61-67.
5. Loscher, W. Transport of GABA at the blood-CSF interface / W. Loscher, H.H. Frey // J. Neurochem. — 1982. — Vol. 38. — N 4. — P. 1072-1079.
6. Abed, W.T. Anticonvulsant activity of di-n-propylacetate and brain monoamine metabolism in the rat / W.T. Abed // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. — 1990. — Vol.17, N1. — P. 11-16.
7. Hallam, K.T. Effect of sodium valproate on nocturnal melatonin sensitivity to light in healthy volunteers / K.T. Hallam, J.S. Olver, T.R. Norman // Neuropsychopharmacology.— 2005. — Vol. 30, N 7. — P.1400-1404.
8. MacMillan, V. The effects of the anticonvulsant valproic acid on cerebral indole amine metabolism / V. MacMillan // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 1979. — Vol. 57, N 8. — P.843-847.
9. Effect of valproic acid on brain serotonin metabolism in isolated and grouped rats / E. Kempf [et al.] // Pharmacol. Biochem. Behav.— 1982. — Vol. 17, N 1. — P. 49-52.
10. Whitton, P.S. The effect of valproic acid on 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid concentration in hippocampal dialysates in vivo / P.S. Whitton, L.J. Fowler // Eur. J. Pharmacol. — 1991. — Vol. 200, N. 1. — P. 167-169.
11. Shukla, G.S. Combined lithium and valproate treatment and subsequent withdrawal: serotonergic mechanism of their interaction in discrete brain regions / G.S. Shukla // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. — 1985. — Vol. 9, N. 2. — P. 153-156.
12. Sodium valproate induced alterations in monoamine levels in different regions of the rat brain / M.H. Baf [et al.] // Neurochem. Int. — 1994. — Vol. 24, N. 1. — P. 67-72.
13. The modification of the ethanol withdrawal syndrome in rats by di-n-propylacetate / E.P. Noble [et al.] // Psychopharmacologia. — 1976. — Vol.46, N2. — P.127- 131.
14. The acute effect of valproate on cerebral energy metabolism in mice / C.U. Johannesen [et al.] // Epilepsy. Res. — 2001. — Vol. 47, N 3. — P. 247-256.
15. Золотухин, М.М. Метод определения метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в эпифизе крысы с помощью ион-парной хроматографии с детектированием по флуоресценции / М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко // Журнал ГрГМУ. — 2007. — № 2. — С.25-28.
16. Voisin, P. Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland / P. Voisin, M.A.A. Namboodiri, D.J. Klein // J. Biol. Chem. — 1984. — Vol. 259, N17. — P. 10913 - 10918.

Поступила 14.05.2008 г.

**М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко,
В.Ю. Смирнов**

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ L-ТРИПТОФАНА И ЕГО КОМБИНИ- РОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ С ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТОЙ НА УРОВНИ ТРИПТОФАНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ, ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Гродненский государственный
медицинский университет